



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3857237 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
G01N 33/68 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2023.06.12
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2023.03.01
(86)	European Application Nr.	20706372.8
(86)	European Filing Date	2020.01.16
(87)	The European Application's Publication Date	2021.08.04
(30)	Priority	2019.01.16, US, 201962792994 P
(84)	Designated Contracting States:	AL; AT; BE; BG; CH; CY; CZ; DE; DK; EE; ES; FI; FR; GB; GR; HR; HU; IE; IS; IT; LI; LT; LU; LV; MC; MK; MT; NL; NO; PL; PT; RO; RS; SE; SI; SK; SM; TR
(73)	Proprietor	REGENERON PHARMACEUTICALS, INC., 777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, NY 10591-6707, USA
(72)	Inventor	WANG, Shunhai, c/o Regeneron Pharmaceuticals, Inc. 777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, New York 10591-6707, USA
(74)	Agent or Attorney	ZACCO NORWAY AS, Postboks 488, 0213 OSLO, Norge

(54)	Title	METHODS FOR CHARACTERIZING DISULFIDE BONDS
(56)	References Cited:	WO-A1-2016/018978 DANIEL F. CLARK ET AL: "Simple Approach to Assign Disulfide Connectivity Using Extracted Ion Chromatograms of Electron Transfer Dissociation Spectra", ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 85, no. 2, 3 January 2013 (2013-01-03), pages 1192-1199, XP055684988, US ISSN: 0003-2700, DOI: 10.1021/ac303124w JUDE C. LAKBUB ET AL: "Disulfide bond characterization of endogenous IgG3 monoclonal antibodies using LC-MS: an investigation of IgG3 disulfide-mediated isoforms", ANALYTICAL METHODS, vol. 8, no. 31, 1 January 2016 (2016-01-01), pages 6046-6055, XP055684989, GBR ISSN: 1759-9660, DOI: 10.1039/C6AY01248E MICHEL PRUDENT ET AL: "The role of copper in cysteine oxidation: study of intra- and inter-molecular reactions in mass spectrometry", METALLOMICS, vol. 1, no. 2, 24 December 2008 (2008-12-24), pages 157-165, XP055268291, GB ISSN: 1756-5901, DOI: 10.1039/B817061D ANJA RESEMANN ET AL: "Rapid, automated characterization of disulfide bond scrambling and IgG2 isoform determination", MABS, vol. 10, no. 8, 2 October 2018 (2018-10-02), pages 1200-1213, XP055684883, US ISSN: 1942-0862, DOI: 10.1080/19420862.2018.1512328 YI WANG ET AL: "Characterization and Comparison of Disulfide Linkages and Scrambling Patterns in Therapeutic Monoclonal Antibodies: Using LC-MS with Electron Transfer Dissociation", ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 83, no. 8, 15 April 2011 (2011-04-15), pages 3133-3140, XP055193121, ISSN: 0003-2700, DOI: 10.1021/ac200128d LAKBUB JUDE C ET AL: "Recent mass spectrometry-based techniques and considerations for disulfide bond characterization in proteins", CORESTA PTM TECHNICAL REPORT, SPRINGER BERLIN HEIDELBERG, DE, vol. 410, no. 10, 18 December 2017 (2017-12-18), pages 2467-2484, XP036460883, ISSN: 1618-2642, DOI: 10.1007/S00216-017-0772-1 [retrieved on 2017-12-18]

XIAOJUAN LI ET AL: "Liquid chromatography and mass spectrometry with post-column partial reduction for the analysis of native and scrambled disulfide bonds", ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 439, no. 2, 1 August 2013 (2013-08-01), pages 184-186, XP055684956, Amsterdam, NL ISSN: 0003-2697, DOI: 10.1016/j.ab.2013.04.021

Enclosed is a translation of the patent claims in Norwegian. Please note that as per the Norwegian Patents Acts, section 66i the patent will receive protection in Norway only as far as there is agreement between the translation and the language of the application/patent granted at the EPO. In matters concerning the validity of the patent, language of the application/patent granted at the EPO will be used as the basis for the decision. The patent documents published by the EPO are available through Espacenet (<http://worldwide.espacenet.com>) or via the search engine on our website here: <https://search.patentstyret.no/>

Patentkrav

1. Fremgangsmåte for å identifisere scramblede disulfidbindinger i et protein-legemiddelprodukt, omfattende:

- 5 å fremstille peptidstandarter omfattende regioner av protein-legemiddelproduktet som inneholder én eller flere disulfidbindinger, hvor en første peptidstandard omfatter en første scrambled disulfidbinding, og en andre standard omfatter en andre og forskjellig scrambled disulfidbinding, og hvor den første og den andre peptidstandard har forskjellige, kjente væskekromatografi-retensjonstider;
- 10 å digerere en prøve av et protein-legemiddelprodukt til peptider; og
- å analysere en prøve inneholdende protein-legemiddelprodukt-peptidene og peptidstandardene under anvendelse av et LC-MS²-system, hvor peptider som påvises ved retensjonstiden av den første standard, indikerer tilstedeværelsen av scrambled disulfidbinding av den første peptidstandard
- 15 til stede i protein-legemiddelproduktet, og peptider som påvises ved retensjonstiden av den andre peptidstandard-retensjonstid, indikerer tilstedeværelsen av de scramblede disulfidbindinger av den andre peptidstandard til stede i protein-legemiddelproduktet.
- 20 **2.** Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor de scramblede disulfidbindinger velges fra gruppen bestående av kryssede disulfidbindinger, på kryss og tvers kryssede disulfidbindinger og intra-kjede-disulfidbindinger.
- 3.** Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 2, hvor fremgangsmåten innbefatter en
- 25 peptidstandard som inneholder en parallell disulfidbinding.
- 4.** Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-3, hvor disulfidbindingene i peptidstandardene tildannes gjennom en oksidasjonsreaksjon som omfatter oksidasjon med Cu²⁺.
- 30 **5.** Fremgangsmåte ifølge krav 4, hvor molforholdet av peptid:Cu²⁺ for tildanning av disulfidbindinger er 5:1

6. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor digerering av prøven omfatter tryptisk digerering eller dual-enzym-digerering.

5 **7.** Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-6, hvor protein-legemiddelproduktet omfatter et antistoff eller et antigenbindende fragment derav, et rekombinant protein, et fusjonsprotein eller en kombinasjon derav.

10 **8.** Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-7, hvor disulfidbindingen er i hengselregionen av et antistoff.

15 **9.** Fremgangsmåte for fremstilling av et protein-legemiddelprodukt, omfattende:
 å fremstille protein-legemiddelproduktet i en cellekultur; å gjennomføre fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1-8, idet scrambled disulfidbindinger av protein-legemiddelproduktet derved identifiseres, og
 å modifisere én eller flere cellekultur-, rense- eller hjelpestoffbetingelser for å redusere mengden av kryssede hengseldisulfidbindinger av protein-legemiddelproduktet til mindre enn 1,0%.

20 **10.** Fremgangsmåte ifølge krav 9, hvor den ene eller de flere cellekultur-, rense- eller hjelpestoffbetingelser som modifiseres, velges fra gruppen bestående av temperatur, pH, oksygennivåer, reaktive oksygenarter, tensider eller kombinasjoner derav.

25 **11.** Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 9-10, hvor protein-legemiddelproduktet velges fra gruppen bestående av et antistoff, et fusjonsprotein, rekombinant protein eller en kombinasjon derav.

30 **12.** Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 9-11, hvor protein-legemiddelproduktet har mindre enn 30% scrambled disulfidbindinger.

13. Fremgangsmåte ifølge krav 12, hvor legemiddelproduktet er et monoklonalt antistoff, og hvor disulfidbindingene er i hengselregionen av antistoffet.